

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-504678

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)6月2日

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 9/64	Z	9161-4B	
A 6 1 K 37/465	A C B	8314-4C	
C 1 2 N 5/10			
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00
		9281-4B	5/ 00
			A
			B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願平4-507422	(71)出願人	ザイモジエネティクス、インコーポレイテ イド
(86) (22)出願日	平成4年(1992)2月28日		アメリカ合衆国、ワシントン 98105、シ アトル、ノースイースト、ルーズベルト
(85)翻訳文提出日	平成5年(1993)8月27日		ウェイ 4225
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 2 / 0 1 6 3 6	(71)出願人	ノボ ノルディスク アクティエゼルスカ ブ
(87)国際公開番号	W O 9 2 / 1 5 6 8 6		デンマーク国、デーコーー2880 バグスバ エルト、ノボ アレ (番地なし)
(87)国際公開日	平成4年(1992)9月17日	(74)代理人	弁理士 宇井 正一 (外4名)
(31)優先権主張番号	6 6 2 , 9 2 0		
(32)優先日	1991年2月28日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 修飾されたファクターV II

(57)【要約】

血液凝固カスケードを効果的に中断する化合物を製造するためにファクターV IIの触媒活性部位が修飾される。この修飾は、ファクターV IIが血漿ファクターX又はI Xを活性化することを実質的に不可能にする。修飾されたファクターV IIの医薬組成物は種々の凝固関連疾患の治療のために使用される。

請求の範囲

1. 患者において血液凝固を阻害する方法であって、血漿ファクターⅩ又はⅠⅩを活性化化する修飾されたファクターⅤⅡの能力を実質的に阻害する修飾を、その触媒中心に少なくとも1つ有するファクターⅤⅡを含んで成る組成物または薬的有効量を患者に投与することを含んで成る方法。

2. 前記修飾がファクターⅤⅡとセリンプロテアーゼ阻害剤との反応を含んで成る、請求項1に記載の方法。

3. 前記阻害剤が有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項2に記載の方法。

4. 前記阻害剤が、D-Phe-Pro-Arg クロメチルケトン又はダンシル-Gly-Gly-Arg クロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである、請求項2に記載の方法。

5. 前記ファクターⅤⅡの修飾が、Ser、Asp 及び His の触媒トライアド中の少なくとも1つのアミノ酸の置換、挿入又は除去を含んで成る、請求項1に記載の方法。

6. 血漿因子Ⅹ又はⅠⅩを活性化化する修飾されたファクターⅤⅡの能力を実質的に阻害する修飾を少なくとも1個活性中心内に有するファクターⅤⅡを、薬液として許容されるキャリアーと共に含んで成る医薬組成物。

7. 前記修飾が、ファクターⅤⅡとセリンプロテアーゼ阻害剤との反応を含んで成る、請求項6に記載の医薬組成物。

8. 前記阻害剤が有機リン化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項6に記載の医薬組成物。

21. ヒト由来である、請求項13に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

22. ウシ由来である、請求項13に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

23. 実質的に純粋である、請求項13に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

24. その活性化部位において阻害される、請求項13に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

25. 組織因子に結合する、請求項13に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

26. 組織因子への結合について野性型ファクターⅩa と競争する、請求項13に記載の修飾されたファクターⅤⅡa。

27. 2つの作用可能に連結された配列コード領域を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、それぞれ、ブレーブペプチドとビタミジン依存性蛋白質の gla ドメイン、並びに Ser、Asp 及び His の触媒トライアド中に少なくとも1つのアミノ酸修飾を有する gla ドメイン含有ファクターⅤⅡをコードしており、ここで発現の際は前記ポリヌクレオチドは、血漿ファクターⅩ又はⅠⅩを活性化する能力を実質的に低下している修飾されたファクターⅤⅡ分子をコードすることを経験されるポリヌクレオチド分子。

28. 前記アミノ酸修飾を有する触媒トライアドが Ser₁₉₅、Asp₁₉₂ 及び His₁₉₃ から構成されている、請求項27に記載のポリヌクレオチド分子。

29. 請求項27のポリヌクレオチド分子によりトランスフェクトされた哺乳類細胞ライン。

30. 前記触媒のトライアドがヒトファクターⅤⅡの Ser₁₉₅、Asp₁₉₂ 及び His₁₉₃ である、請求項28に記載の方法。

7. 前記阻害剤が、D-Phe-Pro-Arg クロメチルケトン又はダンシル-Gly-Gly-Arg クロメチルケトンから選択されたペプチドハロメチルケトンである、請求項6に記載の医薬組成物。

10. 前記ファクターⅤⅡの修飾が、Ser、Asp 及び His の触媒トライアド中の少なくとも1個のアミノ酸の置換、挿入又は除去を含んで成る、請求項6に記載の医薬組成物。

11. ファクターⅤⅡが残基 Ser₁₉₅ の置換によって修飾されている、請求項10に記載の医薬組成物。

12. 前記修飾されたファクターⅤⅡがヒト由来である、請求項6に記載の医薬組成物。

13. 血漿ファクターⅩ又はⅠⅩを活性化化するファクターⅤⅡa の能力を実質的に阻害する、Ser、Asp 及び His の触媒トライアド中の少なくとも1つのアミノ酸修飾を含んで成る、ファクターⅤⅡ。

14. 前記触媒トライアドが Ser₁₉₅、Asp₁₉₂ 及び His₁₉₃ から構成される、請求項13に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

15. 前記アミノ酸修飾が置換である、請求項14に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

16. 前記置換が Ser₁₉₅ においてである、請求項15に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

17. Ser₁₉₅ が Ala、Gly、Met 又は Thr により置換されている請求項16に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

18. Ser₁₉₅ が Ala により置換されている、請求項17に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

19. Asp₁₉₂ が Glu により置換されている、請求項15に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

20. His₁₉₃ が Lys 又は Arg により置換されている、請求項15に記載の修飾されたファクターⅤⅡ。

明 細 書

修飾されたファクターⅤⅡ

発明の分野

本発明は抗凝固剤として有用な蛋白質に関する。さらに詳しくは、本発明は血液凝固を阻害するファクターⅤⅡの修飾に関する。

発明の背景

血液凝固は、最終的にフィブリノゲンを生じさせる種々の血液成分又は因子の複雑な相互作用から成る過程である。一般に、経路「カスケード」と称されていることに関する血液成分は、活性化物質の作用によりそれ自体活性化された凝固因子である蛋白質分解酵素に転換される酵素的に不活性な蛋白質、すなわちプロ酵素又はザイモゲン (zymogen) である。この様な転換を受けた凝固因子は一般に「活性因子」と称され、そして小文字の「a」の添字により示される (例えば、ファクターⅤⅡa)。

活性化されたファクターⅤⅡ (ⅤⅡa) はプロトロンビンのトロンビンへの転換のために必要であり、このトロンビンは次に、フィブリノゲンの形成の最終段階としてフィブリノーゲンをフィブリンに転換する。ファクターⅤⅡの活性化を促進する2つの系又は経路が存在する。「内経路」(intrinsic pathway)は、血液中にのみ存在する因子の利用によりトロンビン形成を導く反応を意味する。一連のプロテアーゼ-介在活性化が最終的にファクターⅠⅩaを生じさせ、これがファクターⅤⅡaと組合わせにおいてファクターⅤⅡaをⅤⅡaに間接させる。血液凝固の「外経路」(extrinsic pathway)において、ファクターⅤⅡaとそのコファクター、すなわち組織

因子により同じ蛋白質分解が行われる。組織因子は組織結合蛋白質であり、そして通常は血漿中で現れない。しかしながら、血管の破壊の際、このものは Ca^{2+} 及びリン脂質の存在下でファクターVIIaと複合体を形成することによりファクターXの活性化又はファクターIXの活性化を触媒する (Nemerson及びGautry, *Biochem.* 25: 4020-4033(1986))。止血におけるこれらの2つの凝固経路の相対的重要性は明らかでないが、近年、ファクターX及び組織因子が血管周囲の細胞において相互の役割を演ずることが見出された。

ファクターVIIは単一ザイモゲンとして血漿中で循環する前駆の血液凝固蛋白質である。ザイモゲンは触媒的に不活性である (Williamsら, *J. Biol. Chem.* 264: 7536-7543(1989))。Raoら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8687-8691(1988))。単鎖ファクターVIIは、ファクターXa、ファクターXIIa、ファクターIXa又はトロンピンによりインビトロで2本鎖ファクターVIIaに変換される。ファクターXaはファクターVIIの主要な生理的活性化物質であると見られる。止血に関係する他のいくつかの血液凝固因子と同様に、ファクターVIIはその活性のためにビタミンKに依存し、それは、蛋白質のアミノ末端に附いている多数のグルタミン酸残基のγ-カルボキシル化のために必要である。これらのγ-カルボキシル化グルタミン酸は、リン脂質と共に、ファクターVIIの金属依存的相互作用のために必要とされる。

ザイモゲンであるファクターVIIの活性化2本鎖分子への転換は、分子の中央近くに位置する内部ペプチド結合の切断により起こる。ヒトファクターVIIにおいて、活性化部位は $\text{Arg}_{151}-\text{Ile}_{152}$ である (Hagenaら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2412-2416(1988))；Thimら, *Biochem.* 27: 7785-7793(1988))。この両者を1つ以上により不明確な位置に組み入れる)。ウシ因子VIIは類似の $\text{Arg}_{151}-\text{Ile}_{152}$ 結合

における開裂により活性化される (Takeuchiら, *J. Biol. Chem.* 263: 14868-14877(1988))。組織因子、リン脂質及びカルシウムイオンの存在下で、2本鎖ファクターVIIaは限定的な蛋白質分解によりファクターX又はファクターIXを急速に活性化化する。

患者において凝固カスケードを選択的にブロックすることがしばしば必要である。抗凝固剤、例えばヘパリン、クマリン、クマリンの前導体、インダンジオン前導体、又は他の阻害剤、例えば血栓溶解の際に、経脈静脈血栓、塞栓性血管内腫瘍 (DIC)、及び他の疾患の増大の予防のために使用することができる。例えば、ヘパリン、又はクエン酸イオンによる体外処理 (米国特許第4,500,389) を適所において用いて急速な凝固の増進を防止することができる。ヘパリンはまた、外科手術を受ける患者における肺動脈血栓症の予防においても使用される。

しかしながら、ヘパリン及び他の抗凝固剤は不所望の副作用を有することができる。入手可能な抗凝固剤は一般に、凝固部位で特異的に作用するのではなく、むしろ全体体で作用する。例えば、ヘパリンは血液の出血を悪化するであろう。さらに、約60%の半減期をもって、ヘパリンは血液から急速に除去され、頻繁に投与しなければならない。ヘパリンはアントロビシン (ATIII) のコファクターとして作用し、そしてATIIIはDICの治療において迅速に効果されるので、適切なヘパリン投与量を維持することがしばしば困難であり、ATIII及びヘパリンのレベルの連続的なモニタが必要である。ヘパリンはまた、ATIIIの阻害が激しい場所には効果がない。さらに、ヘパリンの長期の使用は血小板の数を減少させ、そして血小板の数を減少させ、そして骨髄髄の増進に因する。インダンジオン前導体も毒性副作用を有する。

上に簡単に記載した抗凝固剤に加えて、幾つかの天然蛋白質が抗

凝固活性を有することが知られている。例えば、Reutellingsperger (米国特許第4,738,019) はウシ大動脈及びヒトの肺静脈から抗凝固蛋白質を抽出した。Wakiら (米国特許第4,732,891) はヒト胎盤由来の抗凝固蛋白質を提示している。さらに、ATIIIは歴史的抗凝固剤として提案されている (Schipperら, *Lancet* 1(8068): 854-856(1978))；Jordan, *Am. J. Pathol.* 4,386,025；Bockら, *米国特許第4,517,294。*

比較的低投与量で投与することができ、そして伝統的な抗凝固剤成分が有する不所望の副作用を生じさせない抗凝固活性を有する改良された組成の必要性が当業界に存在する。本発明は、凝固部位において特異的に作用し、そしてさらに他の関連の利点を提供する抗凝固剤を提供することによりこの要求を満たすものである。

発明の要約

抗凝固性を有する修飾されたファクターVIIを含有して成る新規な組成物が提供される。ファクターVIIa配列は少なくとも1個のアミノ酸修飾を有し、この修飾は、血液ファクターX又はIXの活性化を触媒する活性化されたファクターVIIの能力を低下させ、そしてそれにより凝固活性を阻害することができるように選択される。新規ファクターVIIは少なくとも1個のγ-グルタミン酸残基によって修飾された活性部位を有し、そしてその修飾された形態において組織因子と結合することができる。

本発明の組成物は、医薬組成物に調製された場合に患者を治療するための方法において特に有用であり、ここでこれらは、凝固-溶解状態を治療するために、種々の疾患状態を有する個体に投与される。組織因子に結合することができるがしかし凝固カスケード中の他の因子の活性化を触媒する能力が実質的に低下している前駆の

とるファクターVII分子は、より高い血漿半減期を有し、そしてそれ故に他の抗凝固剤と比較した場合には、抗凝固活性の対応して一層長い期間を有するであろう。本発明の組成物についての医学的指示は、抗凝固剤により一般に治療されるもの、例えば深部静脈血栓、肺塞栓、急性、慢性血管内腫瘍 (DIC) 及び心臓塞栓である。従って、患者において凝固を阻害する方法は、Ser¹⁹⁵、Asp¹⁹⁶及びHis¹⁹⁷の修飾トリアド (triad) に少なくとも1つのアミノ酸置換を有するファクターVIIを、凝固を効果的に阻害するのに十分な量において投与することを含んで成る。

典型的には、ヒトへの投与のために、医薬組成物は、修飾されたヒトファクターVIIを天然蛋白質に位置とて所定されるトリアド中の他の部位における置換と組合せにおいて行うことができる。

他の観点において、本発明は、それぞれヒトXIIa-依存性血液凝固蛋白質のブレイクポイント及びglaドメイン、並びにglaドメインを含有するファクターVIIa蛋白質をコードする2つの作用可能に修飾された配列コード領域を含有して成るポリヌクレオチド配列に關し、ここで該領域の前記ポリヌクレオチドは、血液ファクターX又はIXを有意に活性化せずして凝固因子に結合することができる修飾されたファクターVIIa分子をコードする。このポリヌクレオチドにより表現される修飾されたファクターVIIa分子は、生理学的に活性な抗凝固剤である。すなわちこれは、凝固カスケード、そしてそれ故にフィブリンの沈着又はクワットの形成を阻害することができる。

る。この修飾されたファクターV IIを表現させるため、ポリヌクレオチド分子は、哺乳動物系、例えばBHK、BHK...又は...細胞系にトランスフェクトされる。

図面の簡単な説明

図はSer...Ala 修飾ファクターV II DNA配列のための表現ベクターの作製を例示する。使用される配列は、0-1、すなわちアデノウイルス5からの0-1マップユニット1E、すなわちSV40エンハンサー；WLP、すなわちアデノウイルス2主要後期プロモーター；SS、すなわち1組のスパイス部位；及びpA、すなわちSV40からの後期ポリエンターションのポリアデニルーションシグナルを含む。

特定の修飾の記号

抗凝固活性を有する新規な修飾されたファクターV IIが本発明により提供される。この修飾されたファクターV IIはゲイゲン（すなわち、単糖分子）の形態であってもよく、又はその活性化部位において開裂されていてもよい。修飾されたファクターV IIの組成物は、凝固カスケードを阻害するために様々な哺乳類、特にヒトに投与するために適当である。修飾されたファクターV IIは他の抗凝固化合物と結合させて、又はこれに代って投与することができる。

ファクターV IIは凝固カスケード、特に外凝経路 (extrinsic pathway) を含むそれにおいて重要な役割を演ずる。循環する血液中に不活性な単糖ゲイゲン蛋白質として存在し、一旦活性化されれば、ファクターV IIは組織因子及びカルシウムイオンとの組合せにおいてファクターXをX a に活性化し、そしてXをX a に活性化し、最終的にフィブリンネットワークを形成せしめる。

本発明は、ファクターV II a によるファクターX及びI X の活性

化を阻害又は阻害することにより、凝固カスケード中の前記の事象の西を阻害する能力を提供する。本明のファクターV II遺伝子は、ファクターV II a の触媒活性を低下させるように修飾された核酸部位を有するが、この分子は組織因子に結合する能力を維持している。修飾されたファクターV II分子は、組織因子への結合について生じるファクターV II及び又はV II a と競争する。その結果、ファクターX及びI X の活性化が阻害される。

本発明の1つの態様において、ファクターV II a の触媒活性は触媒中心又はトライアドの化学的修飾によって阻害される。該修飾は、例えば、ファクターV IIを、不可逆的阻害剤、例えば有機リン化合物、スルホニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトンもしくはアザペプチドと反応せしめることにより、又はアルシルにより達成される。好ましくはペプチドハロメチルケトンにはPPACK (D-Phe-Pro-Arg クロロメチルケトン；米国特許第4,318,804、引用により本明細書に組み入れる) 及びDQRcK (ダンシル-Glu-Gly-Arg クロロメチルケトン) が含まれる。

他の観点において、ファクターV II a の触媒活性はまた、アミノ酸を置換、挿入又は除去することによっても阻害される。好ましくは残基において、アミノ酸置換は、ファクターV II a の触媒部位に寄与するアミノ酸を含有する領域として本明細書において定義されるファクターV II触媒トライアドのアミノ酸配列中で行われる。触媒トライアド中の置換、挿入及び除去は一般に触媒部位を形成するアミノ酸において、又はその近傍において行われる。ヒト及びウシのファクターV II蛋白質において、触媒トライアドを形成するアミノ酸はSer...Asp...及びHis...である（該残基は配列中の位置を示す）。他の哺乳類からのファクターV II中の触媒部位は、特に蛋白質の置換及びアミノ酸配列分析を含めて現在利用可能な技法を用

いて決定することができる。触媒部位はまた、ある配列を他のセリンプロテアーゼ、特にその活性部位がすでに知られている (Sigler *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 35:149-184(1968)、引用により本明細書に組み入れる) 本モトリプシンと平均させ、そして該平均から類似の活性部位位置を決定することによっても決定することができる。

アミノ酸の置換、挿入又は除去は、ファクターV II a によるファクターX及び又はI X の活性化を阻害又は阻害するように行われる。しかしながら、この事に修飾されたV II a はまた、凝固カスケード中の組織因子への結合について真正なファクターV II及び又はファクターV II a と競争する能力を維持しているべきである。この様な競争は、例えば本明細書に記載の凝固因 (clotting away)、又は細胞表面凝固因子を有するセルリン、例えばヒト膀胱癌セルラインJ82C Sakai *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:9980-9988(1989)、引用により本明細書に組み入れる) を用いての競争結合測定により容易に決定することができる。

ファクターV II中の触媒部位を形成することができるアミノ酸、例えばヒト及びウシファクターV II中のSer...Asp...及びHis...は置換されていても又は除去されてもよい。本発明において、単アミノ酸のみを置換させ、これによって、分子の阻害性を増加させ又は組織因子に結合するその能力を阻害する可能性を最小にすることができる。しかしながら2以上のアミノ酸化（置換、付加、又は除去）を行うことができ、そして置換、付加及び除去（いずれも1又は複数）を行うこともできる。ヒト及びウシのファクターV II、Ser...は好ましくはAla、Gly、Met、Thr 又は他のアミノ酸により置換されていてもよい。ArgをGleにより、そしてHisをIys又はArgにより置換するの好ましい。一般に、置換は蛋白質の三次構造を可能な限り破壊しないように選択される。Dayhoffらのモデ

ル (Atlas of Protein Structure 1978, Nat'l Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) (引用により本明細書に組み入れる) を他のアミノ酸置換の選択におけるガイドとして使用することができる。ヒト、ウシ又は他の種の適当なファクターV II配列の触媒部位に前記のように置換を導入し、そして得られた蛋白質を触媒活性の阻害が生ずる抗凝固活性のレベルについて本明細書に記載するようにして試験することができる。修飾されたファクターV IIについて、触媒活性は実質的に、一般に対応する種の野生型ファクターV IIの触媒活性の約5%未満に、あるいは好ましくは約1%未満に、阻害される。本発明の蛋白質は置換E DNA技法を用いて製造することができる。一般に、クロン化された野生型ファクターV II DNA配列が所望の蛋白質をコードするように修飾される。次に、この修飾された配列が宿主ベクターに挿入され、今度はこれが宿主細胞に挿入転写 (transform又はtransfect) される。高等真核細胞、特に培養された哺乳類細胞が宿主細胞として好ましい。ヒトファクターV IIの完全なヌクレオチド配列及びアミノ酸配列が知られている。米国特許第4,784,950を参照のこと（引用により本明細書に組み入れる）及びこの特許明細書には、置換EヒトファクターV IIのクロニン及び発現が記載されている。ウシファクターV IIの配列はTakeya *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:14868-14872(1988)に記載されている（引用により本明細書に組み入れる）。

アミノ酸配列の変更は種々の技法により達成することができる。DNA配列の修飾は部位特異的変異誘発により行うことができる。部位特異的変異誘発の技法は出願書においてよく知られており、そして例えばZoller及びSmith (DNA 3:479-488, 1984) により記載されている。従ってファクターV IIのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を用いて選択された変換を導入することができる。

本発明に従って修飾されたファクターVⅡには、ビタミンK-依存性血漿蛋白質であるファクターⅠX、ファクターX、プロトロンビン、プロテインC、プロテインS又はプロテインZのいずれか1つのgluドメインにより置換されたアミノ末端部分(gluドメイン)を有する蛋白質が含まれる。ビタミンK-依存性血漿蛋白質のgluドメインは、一般に約30〜約40アミノ酸の長さを有し、C-末端ではそれぞれ遺伝子中のエクソンⅡとⅢの境界の位置に対応する。異源性gluドメインを有するファクターVⅡを製造する方法は米国特許第4,784,850に記載されており、引用により本明細書に組み入れられる。

本発明において使用するためのDNA配列は、典型的にはファクターVⅡ蛋白質のアミノ末端にプレプロペプチドをコードしており、適切な翻訳後プロセス(例えば、グルタミン糖鎖系のγ-カルボキシル化)及び宿主細胞からの分泌が得られる。このプレプロペプチドは、ファクターVⅡのそれよりもよく、あるいは他のビタミンK-依存性血漿蛋白質、例えばファクターⅠX、ファクターX、プロトロンビン、プロテインC又はプロテインSのそれであってもよい。当業者が予想するように、修飾されたファクターVⅡのアミノ酸配列に追加の修飾を行うことができる。この場合これらの修飾は蛋白質が抗原原性として作用する能力を有害に阻害しないものである。例えば、係属中の米国特許出願第07/471,313(引用により本明細書に組み入れる)に一般的に記載されているように、融点トランプド中で修飾されたファクターVⅡはまた、ザイモゲンであるファクターVⅡのその座に置かれた本発明の転換を防止するために陰性転換阻害剤において修飾することもできる。

本発明を実施するために使用するための発現ベクターは、クロ-

ン化遺伝子又はcDNAの転写を指示することができるプロモーターを含んで成るである。培養された哺乳動物細胞において使用するための好ましいプロモーターには、ウイルス性プロモーター及び細胞性プロモーターが含まれる。ウイルス性プロモーターには、SV40プロモーター(Subramanian, *Mol. Cell Biol.*, 1:854-864, 1981)及びCMVプロモーター(Boshart, *Cell*, 41:521-530, 1985)が含まれる。特に好ましいウイルスプロモーターは、アデノウイルス2から主要後期プロモーター(Kaufman及びSharp, *Mol. Cell Biol.*, 2:1304-1319, 1982)である。細胞性プロモーターには、マウス・カッパー遺伝子プロモーター(Bergman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7041-7045, 1983)、及びマウスV。プロモーター(Lohr, *Cell*, 33:85-93, 1982)が含まれる。特に好ましい細胞性プロモーターはマウス・メタロネン-1プロモーター(Painlitter, *Science*, 222:809-814, 1983)である。発現ベクターはまた、プロモーターから下流であって且つファクターVⅡ配列自体のための挿入部位から上流に位置する一セットのRNAスライス部位を含有することができる。好ましいRNAスライス部位はアデノウイルス及び/又は免疫グロブリン遺伝子から得ることができる。また、発現ベクター中には複製開始部位の下流に位置するポリアデニレーションシグナルが含まれる。特に好ましいポリアデニレーションシグナルには、SV40からの前記又は後記ポリアデニレーションシグナル(Kaufman及びSharp, 前掲)、アデノウイルス5' 81領域からのポリアデニレーションシグナル、ヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター(DeMeo, *Nucl. Acids. Res.*, 9:3719-3730, 1981)、又はヒトファクターVⅡ遺伝子もしくはウツファクターVⅡ遺伝子からのポリアデニレーションシグナルが含まれる。発現ベクターはまた、ポリウレウスリーター配列、例えばプロモーターとRNAスライス部位との間に位置するアデノ-

ウイルス2トリパルタイター、及びエンハンサー配列、例えばSV40エンハンサーを含むことができる。

クロン化されたDNA配列は例えば15〜2000塩基対の長さのトランスフェクション(Figler, *Cell*, 14:725-732, 1978; Corsaro及びPearson, *Somatic Cell Genetics*, 7:603-616, 1981; Graham及びVan der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973)又はエレクトロポレーション(Neumann, *EMBO J.*, 1:841-845, 1982)により、培養された哺乳動物細胞に導入される。外来性DNAを発現する細胞を同定しそして選択するため、選択可能な複製型を提供する遺伝子(選択マーカー)が一般に注目した遺伝子又はcDNAと共に細胞に導入される。好ましい選択マーカーには、選択、例えばネオマイシン、ハイグロマイシン、及びメトトレキサートに対する耐性を付与する遺伝子が含まれる。選択マーカーは増殖可能な選択マーカーであることができる。好ましい増殖可能な選択マーカーはヒドロコルレート・レダクターゼ(CHPR)配列である。選択マーカーはTallit (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, MA)引用により本明細書に組み入れる)により記載されている。選択マーカーの選択は当業者のレベルの範囲内である。

選択マーカーは、注目した遺伝子と同時に別のプラスミッド上で細胞に導入することができる。あるいはそれらは同じプラスミッド上で導入することができる。同じプラスミッドの場合、選択マーカー及び注目した遺伝子は異なるプロモーター又は同じプロモーターの制御のもとに置くことができる。後者の配置はトランストランスジェクションを生成する。この型の構成物は当業者において知られている(例えば、Levinson及びSimmons, 米国特許第4,713,339)。細胞に導入される混合物に「キャリアーDNA」として知られる追加のDNAを加えることも有利であろう。

細胞がDNAを取り込んだ後、これを適当な増殖増地中で典型的には1〜2日培養させることにより注目した遺伝子の発現を開始させる。本明細書において使用する場合、「適当な増殖増地」は、細胞の増殖及び修飾されたファクターVⅡ遺伝子の発現のために要求する栄養素及び他の成分を含有する増地を意味する。増地は一般に、炭水化物、蛋白質、必須アミノ酸、必須塩、ビタミン、塩、ホスホリブド、蛋白質及び成長因子を含有する。γ-カルボキシル化され、修飾されたファクターVⅡの生産のため、増地はビタミンKを、好ましくは約0.1 μg/ml〜約5 μg/mlの濃度で含有するであろう。次に、安定に選択マーカーを発現している細胞の増殖について選択を行うために、薬剤による選択が適用される。増殖可能な選択マーカーによりトランスフェクトされた細胞のため、薬剤濃度を増加させて増加したコピー数のクロン化配列について選択し、これによって発現レベルを昇昇させることができる。次に、安定にトランスフェクトされた細胞のクローンを、修飾されたファクターVⅡの発現についてスクリーニングする。

本発明において使用するための好ましい哺乳類セルラインには、COS-1 (ATCC CRL 1650)、ペーパーハムスター腎(BHK)及び293(ATCC CRL 1573; Grahamら, *J. Gen. Virol.*, 35:59-72, 1977)セルラインが含まれる。好ましいBHKセルラインはtk⁺ tk13 BHKセルライン(Wachter及びBaserga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:1106-1110, 1982; 引用により本明細書に組み入れる)(以後、BHK 570細胞と称する)である。このBHK 570セルラインはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection) 12301 Parkmann Dr., Rockville, MD 20852C、ATCCアセクションCRL 10314として寄託されている。tk⁺ tk13 BHKセルラインはまた、アセクションNo. CRL 1632のもとにATCCから入手することもできる。

さらに、多数の他のセルラインを本発明において使用することができ、これらには Rat Hep I (Rat hepatoma:ATCC CRL 1600), Rat Hep II (Rat hepatoma:ATCC CRL 1549), TCML (ATCC CCL 159), ヒト肝 (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1), CHO (ATCC CCL 8), 及びDUX細胞 (Clonau) 及びChasin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4218-4220, 1980)が含まれる。

本発明に従って生産された修飾されたファクターV IIは、抗ファクターV II抗体カラミドのフビニチンロマトグラフィーにより精製することができる。Nakabayashiら, *J.Biol.Chem.* 251:11097-11108(1986) 及びThimら, *Biochem.* 27:7795-7799(1988)の所に本明細書に組み入れる。以下に記載されたカルシウム依存性モノクローナル抗体の使用が特に好ましい。常用の化学的簡易手段、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより追加の精製を達成することができる。クエン酸バリウム沈澱法を含めて、他の精製法が当業者において知られており、本明細書に記載する新規な修飾されたファクターV IIの精製のために適用される(一般に、Scopes, R., *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. 1982 を参照のこと)。少なくとも約90-95%純度の實質的に純粋な修飾されたファクターV IIが好ましく、98-99%又はこれより高い純度のものが、医薬用途のために最も好ましい。前記のように一旦部分的に又は完全に精製されれば、次に、修飾されたファクターV IIを医薬に使用することができる。

本発明の1つの態様において、修飾されたファクターV IIはその活性状態において調製されて、その本状態に販売される。活性化は、当業者において知られている方法、例えば Osteradら, *Biochemistry* 11:2858-2857(1972); Thomas, 米国特許第4,458,581; Hedder及びKistler, *J.Clin. Invest.* 71:1896-1891(1983)又はKistler

及びFujikawa, *Behring Inst.Mitt.* 78:28-42(1983)これらを使用により本明細書に組み入れる)により記載された方法により行うことができる。次に、得られた修飾された「ファクターV II a」は下記のようにして修飾化されて投与される。

本発明の修飾されたファクターV II又はV II a分子は特に血管内凝固を含む種々の状態を治療するために投与するためにより有用である。例えば、深部静脈血栓症及び肺血栓症は常用の抗凝固剤により治療することができるが、ここに記載する修飾されたファクターV IIは、特定された高血栓患者、例えば、手術を受けたもの又は充血性心臓まひの血栓性高併合症の発生を予防するために使用することができる。修飾されたファクターV IIは、ヘパリンより選択性であり、一般に深部静脈血栓症に最も敏感なものと融合するので、そして修飾されたファクターV IIは他の凝固蛋白質を破壊しないので、深部静脈血栓症の予防のために予防的に使用される場合、ヘパリンよりも有効であり、そして出血性症を生じにくい。深部静脈血栓症の予防のための修飾されたファクターV IIの投与量は70 kgの患者に対して約50 μ g \pm 25%の日の範囲、好ましくは1-10mg/日の範囲であり、そして投与は手術の少なくとも約8時間前に始まりそして少なくとも患者が歩行可能になるまで続けられるべきである。完成した深部静脈血栓症及び/又は肺血栓症において、修飾されたファクターV IIの投与量は、患者の体重及び血栓の重症度に応じて、負荷投与量 (loading dose) としての約50 μ g \pm 25%の範囲であり、これに続いて約 500 μ g \pm 10%の日の間の維持投与量である。修飾されたファクターV IIを血中からの出血性併合の可能性があるため、修飾されたファクターV IIは、血栓切除術又は血栓切除術と組合せられた手術中又はその後にヘパリンの投与量を代替する又は減少させることができる。

本発明の修飾されたファクターV II組成物はまた、心臓発生性血栓 (cardiogenic emboli) の予防及び血栓性合併の治療において実質的な用途を有する。出血性合併症を惹起する他の低い可能性及びその選択性のために、修飾されたファクターV IIは発作の犠牲者に与えることができ、そして脳血管性動脈血栓の拡大を予防することができる。修飾されたファクターV IIの投与量は発作の性質及び重症度に応じて各患者ごとに異なり、そして一般に下に示される範囲であろう。

ここに提供される修飾されたファクターV IIの医薬組成物は、修飾されたファクターV IIの体内内崩壊を促進する能力のため、急性心筋梗塞における有用な治療剤であろう。修飾されたファクターV IIは組織プラスミンノーゲンクオパーター又はストレプトキナーゼと共に、心臓梗塞の急性期に投与することができる。急性心筋梗塞においては、患者は少なくとも約91-25mgの修飾されたファクターV IIの負荷投与量 (loading dose)、及びそれに続く約 500 μ g \pm 約10mg/日の維持投与量と与えられる。

本発明の修飾されたファクターV IIは、急性性血管内凝固 (DIC) の治療のために有用である。DICの患者は、広く拡散した微小循環血栓を有してしばしば、必須の凝固因子の消耗から生ずる深刻な出血問題を有する。その選択性のため、修飾されたファクターV IIは、常用の抗凝固剤のようなDICに関連する出血問題を悪化させる。追加の微小循環フィブリン沈着の形成を防止又は阻害するであろう。

医薬組成物、予防的及び/又は治療的処置のための非経腸的、又は局所的投与のために意図される。好ましくは、医薬組成物は経腸的に、すなわち静脈内に、皮下又は筋肉内に投与される。従って本発明は、許容されるキャリアー、好ましくは水性キャリアー

中に溶解した修飾されたファクターV II分子の溶液を含んで成る非経腸投与のための組成物を提供する。種々の水性キャリアー、例えば水、生理食塩水、0.4%食塩水、0.3%グリセリン等を使用することができる。修飾されたファクターV IIはまた、投与の部位への供給又は中流のためにリゾゾーム調製物に製剤化することができる。リゾゾーム調製物は一般に、例えば米国特許第4,837,025、第4,501,728、及び第4,875,282に記載されており、これらの記載を引用により本明細書に組み入れる。この組成物は常用のよく知られた安定化技術により安定化される。生ずる水溶液は使用のために包装され、あるいは無菌条件下で凍結して凍結乾燥され、凍結乾燥された調製物は投与に先立って無菌水溶液と混合される。この組成物は、生産の条件に遅くするために必要な場合には、医薬として貯蔵される増粘物質、例えばPEG調整及び緩衝剤、凍結保護剤等、例えば酢酸ナトリウム、乳糖ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カルシウム等を含有することができる。これらの製剤中の修飾されたファクターV IIの濃度は、広範囲に、すなわち0.5%未満から通常約1%以上、15又は20重量%まで異なることができる。そして選択される投与法の特定の態様に従って、主として液体状態、結晶状により選択されるであろう。

すなわち、静脈注射のための典型的な医薬組成物は、250mlの無菌シリンジ及び10mgの修飾されたファクターV IIを含有するようにすることができる。非経腸的に投与可能な組成物の調製のための実際の方法は当業者に知られており又は自明であり、そして例えば *Remington's Pharmaceutical Science* 16版、Mack Publishing Company, Easton PA(1982)に記載されており、この記載を引用により本明細書に組み入れる。

修飾されたファクターV II分子を含有する組成物は、予防的及び

／又は治療的処置のために投与せし得る。治療的適用において、上記のような病状を有する患者に、該病状及びその合併症を治癒させる又は少なくとも停止させるのに十分な量で投与される。これを達成するために適当な量は「治療的有効量」として定義される。このために効果的な量は既述又は請求の項に記載及び患者の体質及び一般状態に依存するであろうが、しかし一般に70kgの患者に対して、0.05mg〜約25mgの修飾されたファクターV IIの範囲であり、1日当たり約0.5mg〜約10mgの修飾されたファクターV IIがより一般的に使用される。本発明の物質は一般に重症の病状又は傷害、すなわち命にかかわる又は潜在的に命にかかわる状態において使用されることに留意しなければならない。このような例において、外來物質の最少化、及び修飾されたヒトファクターV IIのヒトにおける免疫原性の欠如の観点から、これらの修飾されたファクターV II組成物の実質的過剰量を投与することが可能でありそして治療する医師により好ましいであろう。

予防的適用において、修飾されたファクターV IIを含有する組成物は、患者自身の抗凝固能力を増強するために、病状の状態又は傷害に感受性の又はその危険のある患者に投与される。その量は「予防的有効量」として定義される。この使用において、正確な量はやはり患者の健康状態及び体重に依存するが、しかし一般に70kgの患者当たり約0.1mg〜約25mgであり、より一般的には70kgの体重当たり約0.5mg〜約10mgである。

組成物の1回投与又は複数回投与を行うことができ、投与レベルの維持とパターンは治療する医師により選択される。毎日の維持レベルを必要とする歩行可能な患者のため、修飾されたファクターV IIは、例えばポータルポンプ系を用いて連続注入により投与される。ともかく、医薬製剤は、患者を効果的に処置するのに十分な量

の本発明の修飾されたファクターV IIを提供すべきである。

次の実施例は限定的ではなく例示的に提供される。

実施例 I

Ser...→Ala...ファクターV IIの発現

Ser...→Ala ファクターV II 遺伝的変異体を作成し生成させるため、プラスミド F V II (565+2463) /pIX (未定) 株 (4,744,950) を用いてより本明細書に組み入れる：アメリカン・タイプ・カルキュア・コレクションにアセクシオン 40203として寄託されている）を Xba I 及び Kpn I により消化し、そしてセリジン344のコード領域を含む3.0 kbの断片を回収する。図に示すようにこの断片を Xba I、Kpn I 消化したM13mp19 にクローニングした。以下に記載するこの操作及び引き続き発現は一般に標準的プロトコール（例えば、Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982) に記載されているごとく；引用により本明細書に組み入れる）に従って行われた。

変異オリゴ核酸201658(5'-TGG GGC TGC GGC GTC CCC GTT-3') 及び「ユニバーサル」第二プライマー2087(5'-TGC CAG TCA CGA CGT-3') を用いてZellar及びSmith(前掲)の方法に従ってM13プラスミドで変異導入を行った。反応生成物を、キナーゼ処理された201658を用いてスクリーニングした。陽性クローンを拾い、そして純化DNAを調製し、そして107bpの Pat I 断片から1212bpの Kpn I 断片まで配列決定した。配列分析は所望の変異の存在を確認した。変異クローンを1658と命名した。

次に、1658クローンをを用いて変異ベクターを作成した。変異誘導された配列をM13ベクターから〜0.14kbの Pat I-Kpn I 断片として

単離した。図に示すように、この断片をF V II (565+2463) /pIX からの 1.7kbのHind III-Xba I 断片、F V II (565+2463) /pIX からの 0.5kbの Xba I-Pst I 断片、及びF V II (565+2463) /pIX からの 4.9kbの Kpn I-Hind III断片と連結した。変異クローン及び野生型クローンを Pat I で消化し、そしてM13Hの変異体ファクターV II 挿入部を Kpn I 及び Xba I で消化し、消化されたDNAのサブユニットを調製し、そして放射線標識した201658に結合することにより、目的とする変異体配列の存在を確認した。

ベビーハムスター腎セルラインBHK70 (アメリカン・タイプ・カルキュア・コレクションにアセクシオン 10314として寄託されている) を1658変異ベクターの2つの単離体（#544 及び #545 と称する）によりトランスフェクトした。コンフルエントな10cmプレートのBHK70細胞を5枚の10cmプレート中に、非選択培地（10%のウシ胎児血清及び1%のPSN 抗生物質混合物を含有するDulbecco改良Eagle 増地 (DMEM) (GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, MD)）に転移することにより細胞を調製した。24時間後、細胞が20〜80%コンフルエンスに達した後、これらを、表1に示すように、1958変異をコードする変異ベクターの1つの単離体、プラスミド p488 (アデノウイルス5 ori、SV40エンハンサー、アデノウイルス2主要後期プロモーター、アデノウイルストリポリタリターゲター、5' 及び3' スプライス部位、DHFR^r cDNA並びにSV40ポリAデニレーションシグナルをpUL-1中に含んで成る(Lusky及びBotchan, *Nature* 283:78-81 (1981))、及び10µgのキラーDNA(芽生菌抽出したヤケ種子DNA)により増殖形態転換 (10-transfection)した。DNAを15mlのチューブに加え、そして0.5mlの2×Hepes(25gのHepes、40gのNaCl、1.8gのKCl、0.75gのNa₂HPO₄・2H₂O、

5gのデキストロースを2.5gの葡萄糖に希釈し、そしてpHを6.95〜7.0に調整したもの)を添加し、そして該チューブを混合した。各チューブ中のDNAを0.5mlの0.25M CaCl₂の添加により沈降せしめ、この間にDNA/Hepes 溶液を通じてバスワールピペットにより空気を泡立てた。次に、チューブを振動揺拌し、室温に15分間インキュベートし、そして再度混濁揺拌した。次に、DNA 混合物を細胞のプレート上にピペットを用いて添加した。プレートを揺動し、そして室温に2分間置いた。次に、培地をプレートから除去し、そして2mlのTrie-食塩水で置換した。プレートを2分間室温に置き、次にトリス-食塩水を添加し、そして10mlの非選択培地で置換した。プレートを37°Cにて2日間インキュベートした。

表 1

トランスフェクション (**)

プラスミド名	544	545	544対照	545対照
クローン544	15 µl	—	15 µl	—
クローン545	—	30 µl	—	30 µl
p488	1.5 µl	1.5 µl	—	—
キラーDNA	1.6 µl	1.6 µl	1.6 µl	1.6 µl

2日間のインキュベーションの後、細胞を選択培地（10%の新鮮なウシ胎児血清、1%のPSN 抗生物質混合物及び150mMメソセリンを含有するDMEM）中に播種し、そしてマクブレン中1:100、1:250及び1:500の希釈でプレートした。プレートを37°Cにて1週間インキュベートした。1週間後、培地を変え、そして選択培地で置換し、そしてプレートをコロニー形成についてチェックした。

8日後の、コロニー形成のあとで、#544 及び #545 トランス

フュクシオンプレート1の1:500希釈プレートから、12個のコロニーをランダムに選択した。各コロニーを8-ウェルプレートの1個のウェルにプレートし、そして選択増殖中で増殖させた。7日間の後、プレートはコンフルエントになり、クローン10cmプレート中の選択増殖に分けた。

上記のクローン、及び野生型ファクターVⅡの発現のためにトランスフェクトされた対照細胞、**S-メチオニン-システイン・プロテインラベリングミックス (NPN DuPont Biotechnology Systems, Wilmington, DE)により代謝的に標識した。クローンを増殖せしめ、そして選択増殖中でのパルスラベル実験のために用意した。細胞をリン酸緩衝液 (Sigma, セントルイス, MO)によりすすぎ、そして200μg/mlの³⁵S-Cys-³⁵-Met中で4時間培養した。4時間後、上清及び細胞を収穫した。細胞を、Lenk及びPenman [Cell 19:289-302 (1975)]により記載されているようにして実質的に溶解させ、そして400μMの各細胞溶解物を50μMのSephacryl (Sigma, セントルイス, MO)により沈降させた。

代謝的に標識した細胞からのサンプルを、まず該サンプルを8μMの抗-ファクターVⅡポリクローナル抗体と共に4時間インキュベートすることにより放射免疫沈降 (RIP)した。60μMの洗浄したスタフィロコッカス・プロテアーゼを各サンプルに添加し、そしてサンプルを4℃にて1.5時間通り動かし、サンプルを遠心し、そして上清を除去した。ペレットを、0.7M RIPA 緩液 (10m Tris (pH7.4), 1% NP-40, 4%デオキシコール酸 (Calbiochem Corp., La Jolla, CA), 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5mM EDTA, 0.7M NaCl) 中で2回、そして0.15M RIPA 緩液 (10m Tris (pH7.4), 1%デオキシコール酸 (Calbiochem Corp., La Jolla, CA), 1% Triton X-100, 0.1 SDS, 5mM EDTA, 0.15M NaCl) 中で1回洗浄した。

は、対照 (トランスフェクトされていない) BRK 細胞-コンディション増殖 (ビタミNK+/-)、野生型ファクターVⅡ、及び修飾されたファクターVⅡを発現する細胞の2つの単細胞について、測定の結果を凝固時間として表す。ファクターVⅡ活性は、対照サンプルを超えた凝固時間の短縮として見られる。

表 2

サンプル	希 釈	凝固時間 (秒)
対照 + K	1 : 5	33.1
	1 : 10	33.4
対照 - K	1 : 5	34.3
	1 : 10	33.2
野生型ファクターVⅡ	1 : 20	19.0
	1 : 40	21.5
	1 : 80	23.3
修飾されたファクターVⅡ (#8)	1 : 1	33.5
修飾されたファクターVⅡ (#10)	1 : 1	32.5

血漿ファクターⅤ量に対する修飾されたファクターVⅡの効果は決定するため、修飾されたファクターVⅡ及び経換元野生型又は生来型ファクターVⅡの調製物をファクターX又はファクターⅩのいずれかと共にインキュベートし、そしてその活性化を凝固測定又はポリアクリルアミドゲル電気泳動によりモニターした。

実施例Ⅱ

凝固因子に結合する修飾されたファクターVⅡの能力

凝固因子に結合して野生型ファクターVⅡと競争し、そしてその凝固因子性を阻害する修飾されたファクターVⅡの能力を、限定された量の凝固因子 (トロンボプラスチン) の存在下での一般凝固時間測定

100μMの1×325 色素 (50m Tris-HCl (pH8.8), 100m NaCl, 5m EDTA, 2% SDS, 0.1%ブром フォスホール-10, 10%グリセロール) を各サンプルに加え、そしてサンプルを5分間煮沸し、次に遠心分離によりプロテインAを除去した。50μMの各サンプルを10%ポリアクリルアミドゲル上で泳動させた。結果が示すところによれば、10クローン中9クローンが修飾されたファクターVⅡを分泌した。

実施例Ⅲ

修飾されたファクターVⅡの抗-凝固活性

修飾されたファクターVⅡの凝固時間を阻害する能力を、対照として野生型ファクターVⅡを用いる1段階凝固測定により測定した。経換元血漿を、5μg/mlのビタミNKを含有する増殖中で培養した細胞から本質的に上記のようにして調製した。種々の量の修飾されたファクターVⅡ (クローン544 から) 又は経換元野生型ファクターVⅡを50m Tris (pH7.5)、0.1% BSA 中で100μMに希釈した。この混合物を100μMのファクターVⅡ欠損血漿 (George King Bio-Medical Inc., Overland Park, KS) 及び200μMのヒロンボラスチンC (Bade, Miami, FL; ラビット脳トロンボラスチン及び11.8m Ca²⁺を含有する) と共にインキュベートした。

凝固測定を自動凝固時間測定器 (WLA Electra 800, Medical Laboratory Automation Inc., Pleasantville, NY) において行い、そして正常なブールされたヒト血漿 (1ユニット/mlのファクターVⅡ活性を含む) と予選される、健康な献供者からのクエン酸希釈した血漿をブールすることにより調製した) の1:5~1:640希釈物を用いて作成された標準曲線を用いて、凝固時間をファクターVⅡ活性のユニットに変換した。この測定を用いて、修飾されたファクターVⅡの調製物は検出される凝固活性を示さなかった。表2

法により測定した。

実施例Ⅱに記載したのと同等な一般凝固法により凝固時間を決定した。測定された量の凝固因子、一定量の野生型ファクターVⅡ、及び増加する量の修飾型ファクターVⅡを混合液において使用した。ファクターVⅡ/VⅡαプロアグリゲント活性の阻害は、増加する量の修飾型ファクターVⅡを含有する混合液における凝固時間の延長として見られる。

試験サンプル中のファクターVⅡ活性の量を、正常なブールされた血漿中でファクターVⅡ活性を測定した標準曲線に対する%として計算した。ファクターVⅡ活性についての標準曲線は、リン酸緩衝液 (PBS) 中で正常なブールされた血漿の1:5~1:640にわたる一連の希釈を用いて作成した。この目的のため、正常血漿は約500μg/mlのファクターVⅡを含有すると仮定し、これを1ユニットの活性と考えた。100μMのファクターVⅡ欠損血漿、100μMの血漿希釈物、及び200μMのヒロンボラスチンC (Bade, Miami, FL) の混合物を用いてWLA Electra 800 自動凝固時間測定器での凝固時間を測定した。標準曲線を決定するため、活性 (1:5=100%活性) の%対凝固時間 (秒) として結果をグラフ化した。

この測定は、野生型及び修飾されたファクターVⅡを含有する増殖地が1%未満の血漿を含むことを要求した。凝固時間が標準曲線の範囲に入るように希釈をPBS 中で作した。1:2の最小希釈が典型的であった。最終体積は100μMであった。クローン (#10) 及び「#8」と称する2つの異なるヒトファクターVⅡSer...Ala変形を、この実験において試験した。下記の表に記載する結果は、ファクターVⅡ変形体の量が増加するに従ってファクターVⅡα活性の%が低下することを示した。

表 3

Ser₂₅₁-Ala 変換体についての再測定結果 (10 μg/反応における 100%の活性として B441 (野生型) の平均値を用いた)

Ser ₂₅₁ -Ala 交換 (%)	反応生成物の 増加倍数	B441の 増加倍数	SHK 対照 (%)	ファクター-V II a 活性 (%)
# 10	10 μg	10 μg	0	70
# 10	20 μg	10 μg	0	51
# 10	30 μg	10 μg	0	43
# 10	40 μg	10 μg	0	34
# 10	50 μg	10 μg	0	28
# 10 (-K) ①	20 μg	10 μg	0	76
# 6	10 μg	10 μg	0	74
# 6	20 μg	10 μg	0	56
# 6	30 μg	10 μg	0	48
# 6	40 μg	10 μg	0	41
# 6	50 μg	10 μg	0	32
# 6 (-K)	20 μg	10 μg	0	85
SHK 対照	0	10 μg	20 μg	91
SHK 対照 (-K)	0	10 μg	20 μg	107

(①) トランスフェクトされていないコンディション増地

(②) この記号 (#) が付してあるものの以外は、ファクター-V II 変換体の発現のため、細胞をビタミンKの存在下で増殖させた。

これらの実験が示すところによれば、Ser₂₅₁-Ala 変換を有する変換体は、量依存的にファクター-V II と競争し、そして天然ファクター-V II/V II a のプロアポロラント活性を阻害した。従って、Ser₂₅₁-Ala 変換体はトファクター-V II は従来のヒトファクター

ろによれば、これらの反応条件下で約60分の後にファクター-V II a は十分に不活性化される。

実施例 V

ファクター-V II と BGRcK との反応

実施例 IV に記載するようにして組織系ファクター-V II a を調製した。ファクター-V II a (1 μM) を 0.7mM BGRcK (ダンシル-Glu-Gly-Arg クロモメルケトン: Calbiochem) と共に37℃にて1時間、金体濃 200 μg/ml の 0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl、0.5M BSA、pH7.5 中でインキュベートした。インキュベーションの後、この混合物を一夜、4℃にて2 μg/ml の 0.05M Tris-HCl、0.1M NaCl、pH 7.5 に対して透析した。

遠位のファクター-V II 欠損血漿の凝固時間の変化をモニターすることにより、修飾されたファクター-V II の凝固活性を測定した。100 μg/ml のサンプルを 100 μg/ml のファクター-V II 欠損血漿、ヒト因子III (トロンボプラスチン (Nawroth, *Thromb. Res.* 44, 625-637, 1986) に記載されているようにして調製したもの) 及び25mM CaCl₂ と混合した。正常なプールされたヒト血漿の 1 : 5 ~ 1 : 200 希釈度を用いて作成した標準曲線から、凝固時間をファクター-V II 活性のユニットに変換した。ファクター-V II a と BGRcK とのインキュベーションが、ファクター-V II 凝固活性の完全な喪失をもたらすことが見出された。

以上の記載から、組織因子に結合することができるがしかしファクター-X 及び X を活性化することが実質的にできない、修飾された触媒部位を有するファクター-V II 又は V II a の組成物が提供されることが明らかである。修飾されたファクター-V II は、凝固因子を分解又は消費することなく凝固カスケードを特異的に中断するため作用するので、修飾されたファクター-V II 調製の投与に伴う不所

V II a と競争し、そしてその結果、ヒト血漿中でのファクター-X 及び/又は I 文の活性化を阻害すると結論することができ。

実施例 VI

ファクター-V II と PPACW との反応

組織系ファクター-V II を、トランスフェクトされたベビーハムスター腎細胞において製造した。Thiara (*Biochemistry* 27:7785-7793, 1988)、Brinkous (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1382-1386, 1988)、及びBlaern及びThiara (*Res. Dist.* 228, 564, 1988) (これらの、引用により本明細書に組み入れる) により開示されているようにして、蛋白質を精製しそして活性化した。細胞培養増地を回収し、凍結しそして希釈して濃度を低下させた。次に、再製した増地を、CaCl₂ を含有する緩衝液を用いる陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離した。ファクター-V II 成分を回収し、そしてカルシウム依存性抗-ファクター-V II モノクローナル抗体を用いる免疫クロマトグラフィーによりさらに精製した。2つの陰イオン交換クロマトグラフィー段階を用いて更なる精製を行い、この場合はファクター-V II をそれぞれ CaCl₂ 及び NaCl を用いて除去した。ファクター-V II a が最終精製段階に回収された。

50mM Tris-HCl、100mM NaCl、5 mM CaCl₂ (pH7.4) 中組織系ファクター-V II a (1 μM) を 20 μM PPACW (D-フェニルアラニン-プロリル-アルギニン-クロモメルケトン: Calbiochem, La Jolla, CA) と共に、5、20及び30分間インキュベートした。次に、色原性基質 S2288 (H-D-インソリン-ル-プロリル-ル-アルギニン-p-ニトロアニリド: Kabi Vitrum AB, Molndal, スウェーデン) を含有する緩衝液を添加して、2.5倍の希釈及び 0.3mM S2288 の最終濃度を得た。p-ニトロアニリドの生成を測定し、そして対照として未処理のファクター-V II a を用いる結果と比較した。結果が示すこと

望の副作用は、現在の療法について記載されるよりも少いと予想することができる。さらに、ここに記載される修飾されたファクター-V II は組織系手段により容易に製造することができる。従って、低投与量の効率、便性及び経済性、及び低濃度の投与、並びに毒性が相対的に低いこと、特に本発明により提供される利点である。

以上、本発明を、明確な理解のために説明及び実施例により説明詳細に記載したが、添付される請求の範囲内で種々の変形及び変更を行うことができることは明らかであろう。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. *

C 1 2 N 15/57

// (C 1 2 N 9/64

C 1 2 R 1:91)

識別記号 序内整理番号

ZNA

F I

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO, RU, SD, SE, US

(72) 発明者 パークナー, キャスリーン エル,
アメリカ合衆国, ワシントン 98199, シ
アトル, トゥエンティセカンド アベニュー
ウェスト 3032

(72) 発明者 ベテルセン, ラース クリスティアン
デンマーク国, デーヨーー2970 ホエルス
ホルム, ハベバイ 4

12. $Str_{i+1}^{(k)}$ が16により更新されている。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

14. $Adj_{i+1}^{(k)}$ が16により更新されている。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

15. $Str_{i+1}^{(k)}$ 又は $Adj_{i+1}^{(k)}$ により更新されている。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

16. 上記の項である。隣接列に記憶の移動されたフラグ

タームは、

17. $Str_{i+1}^{(k)}$ である。隣接列に記憶の移動されたフラグター

ムは、

18. 従来の態様である。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

19. 各記憶行単位において実行される。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

20. 記憶行に結合する。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

21. 記憶行に結合する。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

22. 2つの記憶行に結合する。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

23. 2つの記憶行に結合する。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

24. 2つの記憶行に結合する。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

25. 2つの記憶行に結合する。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

26. 2つの記憶行に結合する。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

27. 2つの記憶行に結合する。隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、

28. 隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、隣接列に記憶の移動されたフラグタームは、